



DEUTSCHES
PATENTAMT

- 21 Aktenzeichen: 195 31 348.8
22 Anmeldetag: 25. 8. 95
43 Offenlegungstag: 27. 2. 97

71 Anmelder:

GSF - Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit GmbH, 85764 Oberschleißheim, DE

74 Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

72 Erfinder:

Lindhofer, Horst, Dr., 80999 München, DE;
Thierfelder, Stefan, Prof. Dr., 82223 Eichenau, DE

54 Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten zur selektiven Eliminierung von Zellen in vivo

57 Es werden Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten beschrieben, die zwei unterschiedliche auf einer Tumorzelle lokalisierte Antigene erkennen, sowie Arzneimittel und diagnostische Zusammensetzungen enthaltend diese Antikörper. Die beschriebenen Antikörper und Arzneimittel eignen sich insbesondere zur spezifischen Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen in vivo oder in vitro.

DE 195 31 348 A 1

DE 195 31 348 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten, die zwei unterschiedliche auf einer Tumorzelle lokalisierte Antigene erkennen, sowie Arzneimittel und diagnostische Zusammensetzungen enthaltend diese Antikörper. Die beschriebenen Antikörper und Arzneimittel eignen sich insbesondere zur spezifischen Eliminierung von Tumorzellen in vivo oder in vitro.

Seitdem es möglich ist, monoclonale Antikörper in großen Mengen herzustellen (Köhler und Milstein, Nature 256 (1975), 495), sind viele Versuche zum therapeutischen Einsatz dieser Antikörper zur Tumorbehandlung durchgeführt worden. Neben den anfänglichen Erfolgen im Tiermodell wurden schon früh die Grenzen des Einsatzes monoclonaler Antikörper als therapeutischer Substanz deutlich. Vor allem die Therapiestudien, in denen Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung behandelt wurden, verliefen enttäuschend. Zusammenfassend sind die Hauptprobleme dieses Therapieansatzes bei der Behandlung maligner Erkrankungen folgende:

1. Es muß ein möglichst tumorspezifisches Antigen exprimiert werden. Dies ist bei den meisten malignen Erkrankungen nicht der Fall.
2. Große Tumorknoten oder große Metastasen können mit diesem Ansatz kaum behandelt werden, da die Antikörpermoleküle nicht in ausreichender Menge in diese Tumorknoten eindringen können und somit keine Effektorfunktionen an den Tumorzellen mobilisieren. Beim Vorhandensein großer Tumormassen im Patienten besteht außerdem die Möglichkeit, daß eine bestimmte Subpopulation von Tumorzellen das vom Antikörper erkannte Antigen nicht exprimiert und damit unerkannt bleibt.

Ein sicherer Erfolg beim klinischen Einsatz monoclonaler Antikörper konnte bisher nur dann erzielt werden, wenn Mikrometastasen als Ziel der eingesetzten Antikörper gewählt wurden und ein großer Primärtumor chirurgisch entfernt wurde (Riethmüller et al., Lancet 343 (1994), 1177). Ähnlich wie beim Einsatz cytotoxischer oder cytostatischer Chemotherapeutika zeichnet sich für die Verwendung monoclonaler Antikörper ab, daß verschiedene Therapiemodalitäten miteinander kombiniert werden müssen, um deutliche Erfolge erzielen zu können.

Ein weiterer Nachteil liegt bei den monoclonalen Antikörpern selbst: Antikörper — üblicherweise aus der Maus gewonnen — führen zur Bildung von Anti-Antikörpern, die die Zirkulationszeit und damit die Wirksamkeit des therapeutischen Antikörpers im Menschen stark reduzieren. Diesem Phänomen versucht man durch Humanisierung der Maus-Antikörper entgegenzuwirken.

Ein wesentlich einfacherer Lösungsweg wäre die Selektivität, sowie die Effektorfunktionen der Antikörper so zu verbessern, daß z. B. Mikrometastasen durch eine einmalige oder wenige Gaben (innerhalb einer Woche) von Antikörpern vollständig eliminiert werden könnten.

Um die Effektivität der Antikörper zu erhöhen, wurden und werden weiterhin Versuche unternommen, nicht nur die Tumorzelle mit einem Antikörper zu besetzen, sondern gleichzeitig eine spezifische Immunantwort des Patienten gegen den Tumor zu induzieren. Dazu wurden bispezifische Antikörper entwickelt, die mit dem einen Bindungsarm auf der Tumorzelle, mit dem anderen auf Effektorzellen des Immunsystems binden und diese gegen den Tumor dirigieren (Staerz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 1453). Dieses Wirkungsprinzip gilt aber nur für Tumore, die ein tumorspezifisches Antigen besitzen. Da der Mehrzahl der bekannten Tumorarten ein derartiges tumorspezifisches Antigen fehlt, ist dieses Prinzip zur Tumoreliminierung bei den meisten Tumoren nicht anwendbar. Der Einsatz der bisher verfügbaren Antikörper zur Tumorummuntherapie ermöglicht daher nur in begrenztem Maße eine spezifische Eliminierung der Tumorzellen und ermöglicht insbesondere nicht die spezifische Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen, die kein tumorspezifisches Antigen exprimieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Antikörper und diese enthaltende Arzneimittel zur Verfügung zu stellen, die eine selektive Erkennung und Eliminierung von Zellen in vivo ermöglichen, insbesondere von Tumorzellen, die kein tumorspezifisches Antigen exprimieren.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Antikörper mit mindestens zwei Spezifitäten, wobei von zwei Antigenbindungsstellen mit unterschiedlicher Spezifität zwei unterschiedliche auf einer Tumorzelle lokalisierte Antigene erkannt werden. Der Begriff Spezifität bedeutet dabei die Fähigkeit eines Antikörpers, ein bestimmtes Antigen zu erkennen. Das Antigen kann dabei von einer oder mehreren Antigenbindungsstelle(n) des Antikörpers erkannt werden, die wiederum gleiche oder unterschiedliche Epitope des Antigens erkennen können. Der Begriff "auf einer Tumorzelle lokalisiertes Antigen" umfaßt dabei Antigene, die von einer Tumorzelle exprimiert werden und derart lokalisiert sind, daß sie von Antikörpern gebunden werden können.

Es konnte nun überraschend gezeigt werden, daß sogenannte bispezifische Antikörper, die zwei verschiedene auf einer Zelle lokalisierte Antigene erkennen, (Parham, Human Immunol. 12 (1985), 213; Wong et al., J. Immunol. 139 (1987), 1369) in vivo dazu verwendet werden können, um spezifisch Zellen zu eliminieren. Dieses Prinzip eignet sich insbesondere, um spezifisch Tumorzellen zu eliminieren, die kein spezifisches Tumorantigen exprimieren. Hierzu werden Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten eingesetzt, die eine Kombination von Antigenen erkennen, die ausschließlich oder fast ausschließlich auf Tumorzellen vorkommt.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von Parham (s. o.) und Wong (s. o.), die die Wirkungsweise bispezifischer Antikörper in vitro untersuchten, konnte erstmals gezeigt werden, daß die selektive Bindung und damit verbundene Elimination von bestimmten Zielzellen durch Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten in vivo trotz einer Vielzahl von interferierenden Einflüssen unerwartet hochspezifisch ist. In vivo können unterschiedliche Kompartimente und/oder die Vielzahl von Bindungsmöglichkeiten die Abschwächung der hohen Spezifität

bispezifischer Antikörper durch Kreuzreaktionen zur Folge haben.

Es war möglich zu zeigen, daß Antikörper mit zwei Spezifitäten, die zwei unterschiedliche auf einer Zielzelle lokalisierte Antigene erkennen (siehe Fig. 1), in vivo bei einer bestimmten Konzentration nicht (oder nicht in relevanter Anzahl) an Zellen binden, die nur eines dieser Antigene exprimieren. Unterhalb dieser kritischen Konzentration werden aufgrund der höheren Avidität nur Zellen gebunden und gegebenenfalls zerstört, die beide Antigene exprimieren. Die Tumorselektivität kann durch Verwendung derartiger bispezifischer Antikörper um den Faktor 10–1000 erhöht werden, je nach Affinität der Antigenbindungsstellen des Antikörpers zu den gewählten Antigenen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper weisen im Vergleich zu konventionellen Antikörper den Vorteil auf, daß aufgrund einer höheren Antikörper-Dichte auf den Tumorzellen körpereigene Effektormechanismen zur Tumorerstörung, wie z. B. das Komplementsystem oder die antikörpervermittelte Zytotoxizität mittels Fc-Rezeptor tragender Zellen (ADCC) wesentlich effizienter angreifen oder überhaupt erst den Schwellenwert, der für die Zerstörung der Tumorzelle notwendig ist, überschreiten.

Ferner weisen die erfindungsgemäßen Antikörper den Vorteil auf, daß die Wahrscheinlichkeit, daß Tumorzellen aufgrund der Entstehung von "Escape-Mutanten" nicht mehr erkannt werden, stark herabgesetzt ist, da zwei verschiedene Antigene auf dem Tumor, innerhalb kurzer Zeit, gleichzeitig herunterreguliert werden müßten.

Bei den auf der Tumorzelle lokalisierten Antigenen, die von den erfindungsgemäßen Antikörpern erkannt werden, kann es sich prinzipiell um beliebige von der Tumorzelle exprimierte Antigene handeln.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den auf der Tumorzelle lokalisierten Antigenen, die von den erfindungsgemäßen Antikörpern erkannt werden, um tumorassoziierte Antigene.

Der Begriff tumorassoziiertes Antigen bedeutet dabei, daß diese Antigene vorzugsweise von Zellen des zu eliminierenden Tumors exprimiert werden und/oder sich auf derartigen Tumorzellen in höherer Dichte befinden als auf nicht-malignen Zellen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erkennt der erfindungsgemäße Antikörper mit mindestens einer Antigenbindungsstelle ein tumorassoziiertes Antigen und mit mindestens einer weiteren Antigenbindungsstelle ein nicht-tumorspezifisches Antigen, das auch von nicht-malignen Zellen exprimiert wird. Bei diesem Antigen handelt es sich vorzugsweise um ein Antigen, das spezifisch ist für den Zelltyp oder den Gewebetyp des zu eliminierenden Tumors.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erkennt der Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten zwei normale, nicht-tumorspezifische Antigene, die auch von nicht-malignen Zellen exprimiert werden, die in dieser Kombination jedoch ausschließlich oder fast ausschließlich auf der zu eliminierenden Tumorzelle vorkommen.

Bei den Antigenen, die auf der zu eliminierenden Tumorzelle lokalisiert sind, handelt es sich vorzugsweise um die folgenden Antigene:

CD1, CD2, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD13, CD14, CD23, CD24, einen Ig-Idiotyp, CD33, CD40, CD41, c-erb-2, CALLA (CD10), MHCII, CD44v3, CD44v6, p97, Gangliosid-Gp₂, GD3, C215, das von dem monoklonalen Antikörper 17-1A erkannte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper 9.2.27 erkannte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper NE150 erkannte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper L6 erkannte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper CA125 erkannte Antigen (Mucin), CD19, CD20, CD21, CD22, B220 oder CD5. In den Beispielen wird erläutert welche Kombinationen dieser Antigene sich für die spezifische Erkennung und Eliminierung bestimmter Tumorarten eignen. Neben den zwei Spezifitäten, die zwei verschiedene auf einer Tumorzelle lokalisierte Antigene erkennen, können die erfindungsgemäßen Antikörper weitere Spezifitäten zur Erkennung weiterer Antigene haben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besitzen die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise eine weitere Spezifität, die ein Antigen erkennt, daß spezifisch auf einer Effektorzelle lokalisiert ist. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch trispezifische Antikörper, die zwei auf einer Tumorzelle lokalisierte Antigene als auch ein auf einer Effektorzelle lokalisiertes Antigen erkennen.

Unter dem Begriff Effektorzelle werden dabei Zellen verstanden, die aus der Hämatopoese hervorgehen und cytolytische, Apoptose-vermittelnde oder Phagozytose-Eigenschaften besitzen. Insbesondere umfaßt dieser Begriff T-Zellen, Granulocyten, Monocyten, Makrophagen, NK ("natural killer")-Zellen, Mastzellen und Langerhans-Zellen. Bei dem auf der Effektorzelle lokalisierten Antigen handelt es sich vorzugsweise um ein Antigen, das nicht auf der zu eliminierenden Tumorzelle exprimiert wird. Insbesondere handelt es sich dabei bevorzugt um die Antigene CD3, CD16, CD28, CD32 oder CD64.

Bei den erfindungsgemäßen Antikörper handelt es sich vorzugsweise um monoclonale, chimäre, rekombinante, synthetische, halbsynthetische oder chemisch modifizierte Antikörper, sowie um Fragmente derartiger Antikörper, insbesondere Fv, Fab, scFv oder F(ab)₂-Fragmente.

Sind die erfindungsgemäßen Antikörper für eine in-vivo-Therapie vorgesehen, werden bevorzugt Antikörper oder Derivate oder Fragmente vom Menschen verwendet, oder solche, die derart verändert sind, daß sie sich für die Anwendung beim Menschen eignen (sogenannte "humanized antibodies") (siehe z. B. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Transplantation 57 (1994), 405).

Die Herstellung der verschiedenen oben genannten Antikörpertypen und -fragmente ist dem Fachmann geläufig.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper, die ihren Ursprung vorzugsweise in Säugetieren, z. B. Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen oder Ziege haben, kann mittels herkömmlicher Methoden erfolgen, wie sie z. B. in Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495), in Harlow und Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) oder in Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3) beschrieben sind.

Ferner ist es möglich, die beschriebenen Antikörper mittels rekombinanter DNA-Technologie nach dem Fachmann geläufigen Techniken herzustellen (siehe z. B. Kurucz et al., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Holliger et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6444).

Die Herstellung von Antikörpern mit zwei verschiedenen Spezifitäten, den sogenannten bispezifischen Antikörpern, ist zum einen durch Anwendung rekombinanter DNA-Technologie möglich, aber auch durch die sogenannte Hybrid-Hybridoma-Fusionstechnik (siehe z. B. Milstein et al., Nature 305 (1983), 537). Hierbei werden Hybridomazelllinien, die Antikörper mit jeweils einer der gewünschten Spezifitäten produzieren, fusioniert und rekombinante Zelllinien identifiziert und isoliert, die Antikörper mit beiden Spezifitäten produzieren.

Die Herstellung von Antikörper mit drei Spezifitäten, sogenannte trispezifische Antikörpern, kann beispielsweise derart erfolgen, daß an eine der schweren Ig-Ketten eines bispezifischen Antikörpers eine dritte Antigenbindungsstelle mit einer weiteren Spezifität, z. B. in Form eines "single chain variable fragments" (scFv) angekop-pelt wird. Das scFv kann beispielsweise über einen

—S—S(G₄S)_nD—I-Linker

an eine der schweren Ketten gebunden sein (S = Serin, G = Glycin, D = Aspartat, I = Isoleucin). Fig. 5 zeigt schematisch den Aufbau eines derartigen trispezifischen Antikörpers, der das Antigen CD3 mittels des angekoppelten scFv-Fragmentes erkennt.

Analog dazu können trispezifische F(ab)₂-Konstrukte hergestellt werden, indem die CH₂—CH₃-Regionen der schweren Kette einer Spezifität eines bispezifischen Antikörpers ersetzt werden durch ein scFv mit einer dritten Spezifität, während die CH₂—CH₃-Regionen der schweren Kette der anderen Spezifität beispielsweise durch Einbau eines Stopcodons (am Ende der "Hinge"-Region) in das codierende Gen, z. B. mittels homologer Rekombination entfernt werden (siehe Fig. 6).

Möglich ist auch die Herstellung trispezifischer scFv-Konstrukte. Hierbei werden drei VH-VL-Regionen, die drei verschiedene Spezifitäten repräsentieren, hintereinander in Reihe angeordnet (siehe Fig. 7).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Antikörper mit Substanzen gekoppelt, die die Effektorfunktion der Antikörper, die zur Eliminierung der Zielzelle führen, verbessern.

Die zellzerstörende Wirkung von Antikörpern beruht normalerweise auf den Effektorfunktionen der Fc-Region der Antikörper. So können z. B. Fc-Rezeptor-tragende Zellen an eine mit Antikörper besetzte Zelle binden und diese zerstören. Diese auch als ADCC ("antibody dependent cell mediated cytotoxicity") bezeichnete Reaktion reicht jedoch häufig nicht aus, um effektiv alle Zielzellen zu zerstören.

Bei den Substanzen, die an die in den erfindungsgemäßen Arzneimitteln enthaltenen Antikörper gekoppelt werden können, handelt es sich vorzugsweise um Enzyme, toxische Substanzen, Biotin, Radionuclide oder Superantigene.

In Zusammenhang mit der Kopplung eines Antikörpers mit einem Enzym ist beispielsweise die von Rodrigues et al. (Cancer Res. 55 (1985), 63) beschriebene sogenannte "antibody dependent enzyme mediated prodrug therapy" (ADEPT) zu nennen. Bei diesem Verfahren wird die Vorstufe einer toxischen Substanz unmittelbar am vorgesehenen Wirkort, beispielsweise an der Tumorzelle, durch ein Enzym, das an den Antikörper gekoppelt ist, aktiviert. Dieses Prinzip ist umso effizienter und freier von Nebenwirkungen, je spezifischer der verwendete Antikörper die Zielzelle erkennt. Ein bevorzugt in dieser Methode verwendetes Enzym ist beispielsweise die β -Lactamase.

Beispiele für toxische Substanzen, die direkt an die erfindungsgemäßen Antikörper gekoppelt werden können, sind Ricin, Saporin oder Pertussis-Toxin.

Durch die Kopplung der erfindungsgemäßen Antikörper mit Biotin ist es ferner möglich, an Avidin konjugierte Substanzen an Zielzellen anzureichern.

Vorteilhaft ist dies beispielsweise bei der Applikation von Radionuclid-Avidin-Konjugaten. In diesem Fall werden die Konjugate erst verabreicht, wenn der mit Biotin gekoppelte Antikörper bereits an die Zielzelle gebunden hat. Die Konjugate werden aufgrund der hohen Affinität zwischen Biotin und Avidin sehr spezifisch an den Zielzellen angereichert. Ungebundene Radionuclid-Avidin-Konjugate werden dagegen aufgrund ihrer geringen Größe schnell aus dem Organismus entfernt.

Der Vorteil der Verwendung derartiger Antikörper ist eine relative geringe unspezifische radioaktive Belastung des Patienten bei ihrer Anwendung.

Ferner können die erfindungsgemäßen Antikörper mit einem Superantigen gekoppelt sein. Superantigene sind extrem potente Aktivatoren von T-Zellen. Ein Beispiel ist das SEA ("staphylococcal enterotoxin A"). T-Zellen werden durch Superantigene zur Proliferation sowie zur Freisetzung von Cytokinen und der Cytolyse benachbarter Zellen angeregt. Ausgelöst wird diese unkontrollierte, systemische T-Zellaktivität durch Bindung der Superantigene an konservierte Bereiche von MHCII-Molekülen bzw. die V β -Kette des T-Zellrezeptors. Dohlstien et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 8945) beschreibt, daß die unspezifische Bindung an MHCII durch eine spezifischere Antigenbindungsstelle eines Antikörpers ersetzt werden kann. Dadurch gelingt es, die T-Zellaktivierung wesentlich kontrollierter ablaufen zu lassen. Durch geeignete Kombination der Antigeneigenschaften eines Antikörpers kann auch hier die Cytolyse-Wirkung der aktivierten T-Zellen auf eine bestimmte Zielzelle begrenzt werden.

Bei der Herstellung von Antikörpern, die mit einem Superantigen gekoppelt sind, wird beispielsweise eine der schweren Immunglobulinketten eines Antikörpers oder Antikörperfragmentes um eine T-Zell-aktivierende Superantigensequenz verlängert. Dabei kann diese Sequenz z. B. über einen

—S—S(G₄S)_nD—I-Linker

mit einer der schweren Ig-Ketten verbunden sein. Das Anfügen der Linker- und Superantigensequenzen an die schwere Ig-Kette kann beispielsweise mittels homologer Rekombination auf DNA-Ebene in einer Hybridoma-

zelllinie stattfinden (Land und Mocikat, Mol. Gen. Genet. 242 (1994), 528). Eine derartige Konstruktion eines bispezifischen Antikörpers mit einer Superantigensequenz ist beispielhaft in Fig. 2 gezeigt.

Ferner ist es möglich, F(ab)₂-Fragmente mit einem Superantigen zu koppeln. Dies ist in Fig. 3 beispielhaft für ein bispezifisches F(ab)₂-Fragment gezeigt. In diesem Fall werden die CH₂, CH₃-Regionen einer schweren Immunglobulinkette durch eine Superantigensequenz ersetzt, während die CH₂, CH₃-Regionen der anderen schweren Immunglobulinkette durch den Einbau eines Stopcodons mittels homologer Rekombination entfernt wurden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, sogenannte "single chain variable fragments" (scFv) mit einem Superantigen zu koppeln. Dies ist beispielhaft für ein derartiges bispezifisches Fragment in Fig. 4 gezeigt. Hierbei werden beispielsweise lediglich die V-Regionen mit verschiedener Spezifität aneinandergekoppelt bei vollständiger Entfernung der konstanten Antikörperregionen und anschließend wird an eine der V-Regionen wie oben beschrieben eine Superantigensequenz gekoppelt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel, die Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten, vorzugsweise bispezifische Antikörper, enthalten, wobei der Antikörper mindestens zwei unterschiedliche auf einer Zielzelle lokalisierte Antigene erkennt. Bei der Zielzelle kann es sich generell um jede beliebige Zelle handeln, vorzugsweise um eine Zelle, die eliminiert werden soll, beispielsweise eine Tumorzelle. Bei den auf der Zielzelle lokalisierten Antigenen handelt es sich vorzugsweise um Antigene, die in dieser Kombination ausschließlich oder fast ausschließlich von der Zielzelle exprimiert werden. Die in den Arzneimitteln enthaltenen Antikörper können wie oben beschrieben modifiziert sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Arzneimittel, die oben beschriebene erfindungsgemäßen Antikörper enthalten. Derartige Arzneimittel können neben den Antikörpern gängige, dem Fachmann geläufige pharmazeutisch verträgliche Trägerstoffe enthalten.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Antikörpern mit zwei oder mehr Spezifitäten, vorzugsweise bispezifischen Antikörpern, die mindestens zwei unterschiedliche auf einer Zielzelle lokalisierte Antigene erkennen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur in vivo Immuntherapie.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den Antikörpern um die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Antikörper.

Bei der Immuntherapie handelt es sich vorzugsweise um eine Therapie zur Behandlung von Tumoren, insbesondere von B-Zell-Lymphomen, kolorektalen Karzinomen, Melanomen, Ovarial-Karzinomen, Glioblastomen (maligne Gliome) oder Mamma-Karzinomen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung diagnostische Zusammensetzungen, die Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten enthalten, die mindestens zwei unterschiedliche auf einer Zielzelle lokalisierte Antigene erkennen, oder die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Antikörper.

Fig. 1 zeigt die prinzipiell Wirkungsweise bispezifischer Antikörper

Fig. 2 zeigt schematisch einen mit einer Superantigensequenz gekoppelten bispezifischen Antikörper

Sag = Superantigensequenz

bsAK = bispezifischer Antikörper

Fig. 3 zeigt schematisch ein bispezifisches F(ab)₂-Superantigenkonstrukt

Sag = Superantigensequenz

bsF(ab)₂ = bispezifisches F(ab)₂-Fragment

Fig. 4 zeigt schematisch ein bispezifisches "single chain variable fragment"-Superantigen-Konstrukt

Sag = Superantigensequenz

bs-scFv = bispezifisches "single chain variable fragment"

Fig. 5 zeigt schematisch einen trispezifischen Antikörper, bei dem ein "single chain variable fragment", das CD3 erkennt, über einen Linker an eine der schweren Ketten eines bispezifischen Antikörpers gekoppelt wurde.

Fig. 6 zeigt schematisch ein trispezifisches F(ab)₂-Konstrukt, bei dem eine schwere Kette eines bispezifischen Antikörpers durch ein scFv-Fragment ersetzt wurde, das CD3 erkennt, und bei dem die andere schwere Kette entfernt wurde.

Fig. 7 zeigt schematisch ein trispezifisches scFv-Konstrukt

Fig. 8 zeigt die Ergebnisse von den zwei in Beispiel 9 beschriebenen Versuchen, bei denen SCID-Mäusen Thymomzellen injiziert wurden und die Mäuse anschließend mit bispezifischen Antikörpern zur Depletion der Thymomzellen behandelt wurden.

Dargestellt ist die Überlebensrate in % der behandelten Tiere im Verlauf der Zeit.

Die Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1

Antikörper zur spezifischen Erkennung und Eliminierung von B-Zell-Lymphomen

Um selektiv B-Zell-Lymphomzellen zu eliminieren, bieten sich folgende Antigenkombinationen an, die mit bispezifischen (bsAk) Antikörpern spezifisch erkannt werden können:

a) anti-CALLA (CD10)/anti-CD19 (oder CD20, CD21, CD22, CD23, CD24)

CALLA ist ein lymphomassoziiertes Proliferationsmarker; CD19-CD24 sind B-Zellmarker. Tumorzellen, die diese Antigenkombination tragen, werden von einem bsAk mit den oben genannten Spezifitäten depletiert; native B-Zellen, die lediglich B-Zellmarker (CD19-24) tragen und kein CALLA Antigen exprimieren, werden dagegen nicht depletiert.

b) anti-CD44v6 (oder anti-CD44v3)/CD19 (oder CD20, CD21, CD22, CD23, CD24)

Die CD44 Variante v6 wird verstärkt während der Tumorprogression exprimiert (Mulder et al., Lancet 34 (1994), 1470); CD19-CD24 s. o.

c) anti-CD44v6 (oder anti-CD44v3)/anti-CALLA

d) anti-B220/anti-CD5

CD5 wird häufig auf B-CLL oder zentrozytischen Lymphomen exprimiert.

B220 ist ein B-Zellmarker.

e) anti-CD19 (oder CD20, CD21, CD22, CD23, CD24)/anti-CD5

f) anti-MHCII/anti-CD5 (oder anti-CALLA, anti-CD44v6, anti-B220, anti-CD19 bis 22, oder anti-CD24)
B-Zell-Lymphome exprimieren häufig MHCII.

g) anti-Ig-Idiotyp in Kombination mit einer Spezifität, die ein B-Zell-Lymphom-assoziiertes Antigen oder einen B-Zellmarker erkennt.

Beispiel 2

Antikörper zur spezifischen Erkennung und Eliminierung von kolorektalen Karzinomen

Um selektiv kolorektale Karzinome zu eliminieren, bieten sich Antikörper mit folgenden Spezifitäten an:

a) anti-CD44v6 (oder anti-CD44v3)/17-1A

17-1A ist ein monoklonaler Antikörper der ein mit Kolorektalen-Karzinom-Zellen und Mamma-Karzinom-Zellen assoziiertes Antigen erkennt (Herlyn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 1438).

b) anti-p97/17-1A

p97 ist ein mit Kolon-Karzinomen und Melanomen assoziiertes Antigen (Hellström et al., J. Immunol. 127 (1981), 157).

c) anti-CD44v6 (oder anti-CD44v3)/anti-p97

d) anti-C215/17-1A

C215 ist ein Kolon-Adenokarzinom bzw. Mammakarzinom-assoziiertes Antigen. Es handelt sich dabei um ein Epitop, das ebenfalls auf dem tumorassoziierten Antigen GA-733-2 vorkommt und folgende Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code aufweist:

AKPEGALQNNDGLYDPDXD (Björk et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 24232).

e) anti-C215/anti-CD44v6 (oder anti-CD44v3)

f) anti-C215/anti-p97

Beispiel 3

Antikörper zur spezifischen Erkennung und Eliminierung von Melanomen

Zur Eliminierung von Melanomzellen bieten sich folgende Kombinationen an:

a) anti-p97/anti-CD44v6 (oder anti-CD44v3)

b) anti p97/9.2.27

Der monoklonale Antikörper 9.2.27 bindet auf einem Melanom-assoziierten Glykoprotein (Morgan et al., Hybridoma 1 (1981), 27).

c) anti-GD3/9.2.27

Der monoklonale Antikörper anti-GD3 bindet auf einem Melanom-assoziierten Protein (Dippold et al., Eur. J. Cancer Clin. Onc. 21 (1988), 65).

Beispiel 4

Antikörper zur spezifischen Erkennung und Eliminierung von Mamma-Karzinomen

Mamma-Karzinome können beispielsweise durch Antikörper mit folgenden Spezifitäten erkannt werden:

a) L6/anti-c-erb-2

L6 ist ein monoklonaler Antikörper, der ein mit Mamma-Karzinom assoziiertes Antigen erkennt (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 3439). c-erb-2 ist ein mit Mamma- und Ovarial-Karzinomen assoziiertes Antigen.

b) L6/anti-C215

c) anti-C215/anti-c-erb-2

Beispiel 5

Antikörper zur spezifischen Erkennung und Eliminierung von Ovarial-Karzinomen

Zur Erkennung von Ovarial-Karzinomen bietet sich die Kombination an:

anti-Mucin (CA125)/anti-c-erb-2.

Der monoclonale Antikörper CA125 erkennt ein auf Ovarial Karzinomen stark exprimiertes Antigen (Larson et al., Int. J. Cancer 42 (1988), 877).

Beispiel 6

Antikörper zur spezifischen Erkennung und Eliminierung eines malignen Glioms (Glioblastom)

Die Erkennung von Glioblastomen kann beispielsweise durch folgende Kombinationen erfolgen:
NE150/9.227

Die monoclonalen Antikörper NE150 (Nitta et al., Lancet 335 (1990), 368) und 9.227 (Schrappe et al., Cancer Res. 51 (1991), 4986) binden beide auf unterschiedlichen Gliom-assoziierten Antigenen.

Beispiel 7

Antikörper zur spezifischen Erkennung und Eliminierung von Neuroblastom-Zellen

Zur Erkennung von Neuroblastomzellen bieten sich Antikörper an, die das Antigen Gangliosid GD_2 in Kombination mit einem weiteren Neuroblastom-spezifischen Antigen oder einem Zell- oder gewebespezifischen Antigen erkennen.

Beispiel 8

Antikörper zur Erkennung und Eliminierung von weiteren Leukämien

Für die Erkennung und Eliminierung von T-Zell- und myeloischen sowie nicht eindeutig klassifizierbaren Leukämien bieten sich Antikörper an, die Kombinationen der folgenden Antigene erkennen:
CD1, CD2, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD13, CD14, CD23, CD24, CD33, CD40 und CD41.

Beispiel 9

Selektive Depletion von Tumorzellen in vivo

Um die Anwendbarkeit des Prinzips der "selektiven Depletion" mittels bi- und, davon abgeleitet, tri-spezifischer Antikörper zur Zerstörung von Tumorzellen in vivo zu prüfen, wurden 2×10^4 syngene ST-1-Thymomzellen mit dem Phänotyp $CD4^+$, $CD8^+$, $Thy-1.2^+$ in SCID-Mäuse injiziert. Da bei der SCID-Maus die normale T-Zell-Reifung gestört ist, werden in derartigen Tieren so gut wie keine $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen gebildet. Es werden aber $Thy-1.2^+$, $CD4^-$, $CD8^-$ Zellen gebildet, die etwa 20% der Zellen im peripheren Blut ausmachen. Zur selektiven Depletion der Tumorzellen wurde ein bispezifischer Antikörper (bsAk) mit den Spezifitäten anti- $Thy-1.2$ x anti- $CD8$ verwendet.

Vier Tage nach Tumorzell-Injektion wurden den Tieren (6+6, Versuche 1+2) $10 \mu g$ des o.g. bispezifischen Antikörpers injiziert bzw. die äquimolare Menge an parentalen anti- $CD8$ und anti- $Thy-1.2$ Antikörpern (ebenefalls 12 Tiere, Versuche 1+2) oder kein Antikörper (12 Tiere, Versuche 1+2). Während sämtliche Tiere, die keinen bsAk erhalten hatten, starben, überlebten 5 der 12 mit bsAk behandelten Tiere bei allgemeiner Lebenszeitverlängerung (statistisch signifikant im log rank Test, $p(0,02)$) (siehe Fig. 8). Darüberhinaus wurde im peripheren Blut der mit bsAk behandelten Mäuse kein Rückgang der $Thy-1.2^+$, $CD4^-$, $CD8^-$ Zellen festgestellt, während die Kombination der parentalen Antikörper (anti- $Thy-1.2$, anti- $CD8$) zu einem Rückgang von 20% auf 11% dieser Zellen führte. Letztere Beobachtung zeigt, daß bei einer bestimmten Serumkonzentration des bsAk im Blut eines behandelten Patienten bevorzugt Zellen, die beide Antigene exprimieren, von derartigen bsAk attackiert werden, während Zellen, die nur eines der beiden Zielantigene exprimieren, verschont bleiben.

Beispiel 10

Selektive Depletion von ($CD8^+$ / $Thy1.2^+$) - T-Zellen durch bispezifische Antikörper in vivo

In einem weiteren Versuch wurde normalen immunkompetenten BALB/c-Mäusen ebenfalls der in Beispiel 9 beschriebenen bsAk sowie die dazugehörigen parentalen Antikörper in den angegebenen äquimolaren Mengen injiziert.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 1 dargestellt. Zur Erläuterung der Tabelle: RmCD8-6 = Antikörper mit Spezifität anti- $CD8$; MmT1 = Antikörper mit Spezifität anti- $Thy-1.2$; bsAk = bispezifischer Antikörper; BiB = bispezifischer Antikörper mit den Spezifitäten RmCD8-6 x MmT1.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, depletieren $5 \mu g$ des bsAk BiB spezifisch die ($CD8^+$, $Thy-1.2^+$) - Zellen fast vollständig von 14,5% auf 0,8%, während die ($CD4^+$, $Thy-1.2^+$) - Zellen bei der verabreichten Antikörperdosis verschont bleiben.

Die äquimolare Menge an parentalen Antikörpern $2,5 + 2,5 \mu g$ depletiert lediglich $CD8^+$ Lymphozyten, auf denen beide parentalen Akbinden können, marginal von 14,5% auf 12,6%. Erklärt werden kann diese Beobachtung durch einen geringeren Antikörper-Besatz auf den $CD8^+$ Lymphozyten durch die parentalen Antikörper im Vergleich zu dem bsAk, da die parentalen anti- $Thy-1.2$ Antikörper auch auf z. B. $CD4^+$ Lymphozyten binden, sich dadurch auch auf anderen Geweben verteilen und somit bei dieser geringen Antikörpergabe die $CD8^+$

Lymphozyten nicht mehr zu 100% absättigen können. D.h. bei dieser geringen Antikörperkonzentration kann der zur Lyse der Zielzellen mittels ADCC notwendige Schwellenwert für den Antikörperbesatz (fast) nur noch von den bsAk aufgrund deren höherer Selektivität für die Zielzellen erreicht werden.

Tabelle 1

Depletion von CD4 + und CD8 + T-Zellen mittels parentaler und bispezifischer Antikörper nach 4 Tagen

Lymphknoten (Balb/c)

inj. Antikörper	[μ g]	Thy-1.2+/CD4+%	Thy-1.2+/CD8+%
RmCD8-6	5	52,6	11,8
RmCD8-6 + MmT1	2,5+2,5	49,3	12,6
RmCD8-6 + MmT1	5+5	47,8	10
BiB	5	59,9	0,8
Kontrolle	-	40,4	14,5

Patentansprüche

1. Antikörper mit mindestens zwei Spezifitäten, **dadurch gekennzeichnet**, daß von mindestens zwei Antigenbindungsstellen mit unterschiedlicher Spezifität zwei unterschiedliche auf einer Tumorzelle lokalisierte Antigene erkannt werden.
2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß von den Antigenbindungsstellen, die zwei unterschiedliche auf der Tumorzelle lokalisierte Antigene erkennen, zwei verschiedene tumorassoziierte Antigene erkannt werden.
3. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß von den Antigenbindungsstellen, die zwei unterschiedliche auf der Tumorzelle lokalisierte Antigene erkennen, mindestens eine Antigenbindungsstelle ein tumorassoziiertes Antigen erkennt und mindestens eine weitere Antigenbindungsstelle ein Antigen erkennt, das auch von nicht-malignen Zellen exprimiert wird.
4. Antikörper nach Anspruch 3, wobei das Antigen, das auch von nicht-malignen Zellen exprimiert wird, ein Antigen ist, das spezifisch für den Zell- oder Gewebetyp des Tumors ist.
5. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß von den Antigenbindungsstellen, die zwei unterschiedliche auf einer Tumorzelle lokalisierte Antigene erkennen, zwei nicht-tumorspezifische Antigene erkannt werden, die in Kombination ausschließlich oder fast ausschließlich auf der Tumorzelle vorkommen.
6. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die auf der Tumorzelle lokalisierten Antigene die Antigene CD1, CD2, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD13, CD14, CD23, CD24, einen Ig-Idiotyp, CD33, CD40, CD41, c-erb-2, CALLA (CD10), MHCII, CD44v3, CD44v6, p97, Gangliosid-GD-2, GD3, C215, das von dem monoklonalen Antikörper 17-1A-erkannte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper 9.2.27 erkannte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper NE150 erkannte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper L6 erkannte Antigen, das von dem monoklonalen Antikörper CA125 erkannte Antigen (Mucin), CD19, CD20, CD21, CD22, B220 oder CD5 sind.
7. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Antikörper eine weitere Spezifität besitzt, die ein auf einer Effektorzelle lokalisiertes Antigen erkennt.
8. Antikörper nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das auf der Effektorzelle lokalisierte Antigen nicht auf der Tumorzelle vorhanden ist.
9. Antikörper nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem auf der Effektorzelle lokalisierten Antigen um das Antigen CD3, CD16, CD28, CD32 oder CD64 handelt.
10. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei es sich um einen monoklonalen Antikörper, einen durch rekombinante DNA-Technologie hergestellten Antikörper, einen halbsynthetischen oder synthetischen Antikörper, um einen chemisch modifizierten Antikörper oder um ein Fragment eines solchen Antikörpers handelt.
11. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Antikörper gekoppelt ist mit einem Enzym, einer toxischen Substanz, einem Radionuclid, Biotin oder einem Superantigen.
12. Arzneimittel enthaltend mindestens einen Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten, der zwei unterschiedliche auf einer Zielzelle lokalisierte Antigene erkennt, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Trägerstoff.
13. Arzneimittel nach Anspruch 12, wobei der Antikörper ein Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 11 ist.

14. Verwendung eines Antikörpers mit zwei oder mehr Spezifitäten, der zwei unterschiedliche auf einer Zielzelle lokalisierte Antigene erkennt, zur Herstellung eines Arzneimittels zur in vivo Immuntherapie.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei der Antikörper ein Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 11 ist.

16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei die Immuntherapie eine Therapie zur Behandlung eines Tumors ist. 5

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der Tumor ein B-Zell-Lymphom, ein kolorektales Karzinom, ein Melanom, ein Ovarialkarzinom, ein Glioblastom (malignes Gliom) oder ein Mamma-Karzinom ist.

18. Diagnostische Zusammensetzung enthaltend mindestens einen Antikörper mit zwei oder mehr Spezifitäten, der zwei unterschiedliche auf einer Zielzelle lokalisierte Antigene erkennt. 10

19. Diagnostische Zusammensetzung nach Anspruch 18, wobei der Antikörper ein Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 11 ist.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

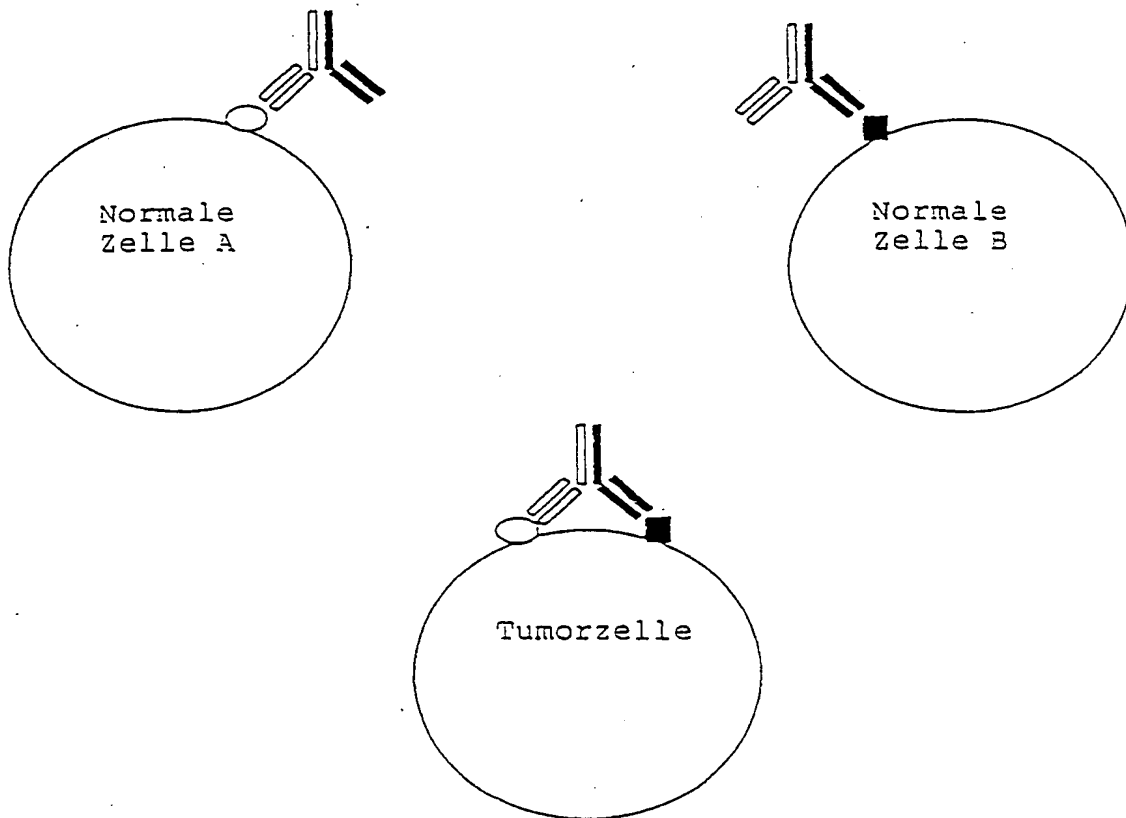
50

55

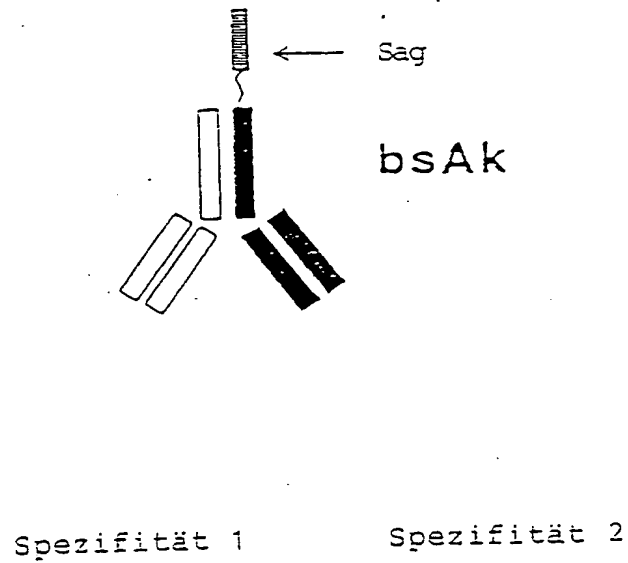
60

65

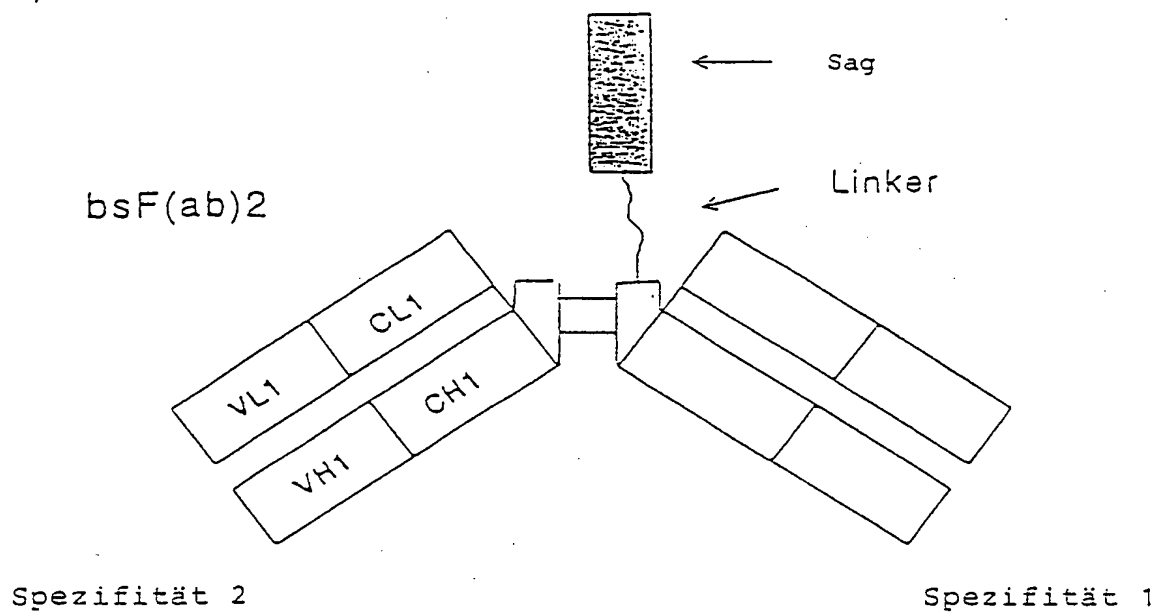
- Leerseite -



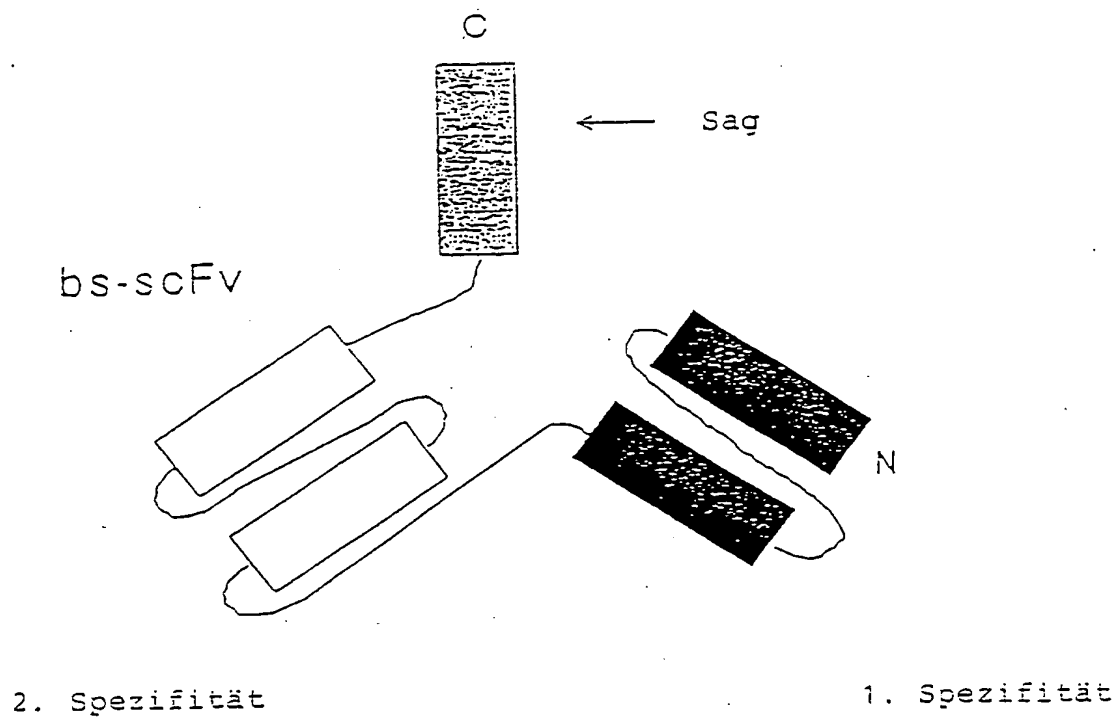
Figur 1



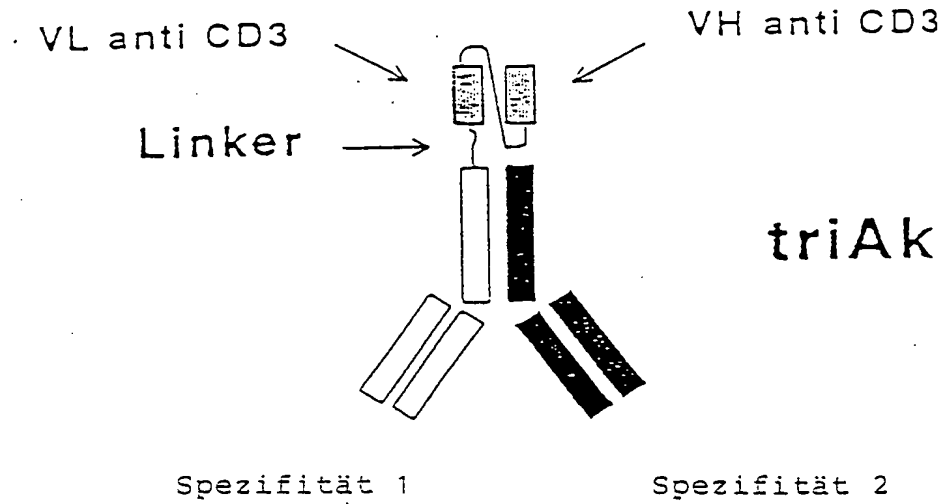
Figur 2



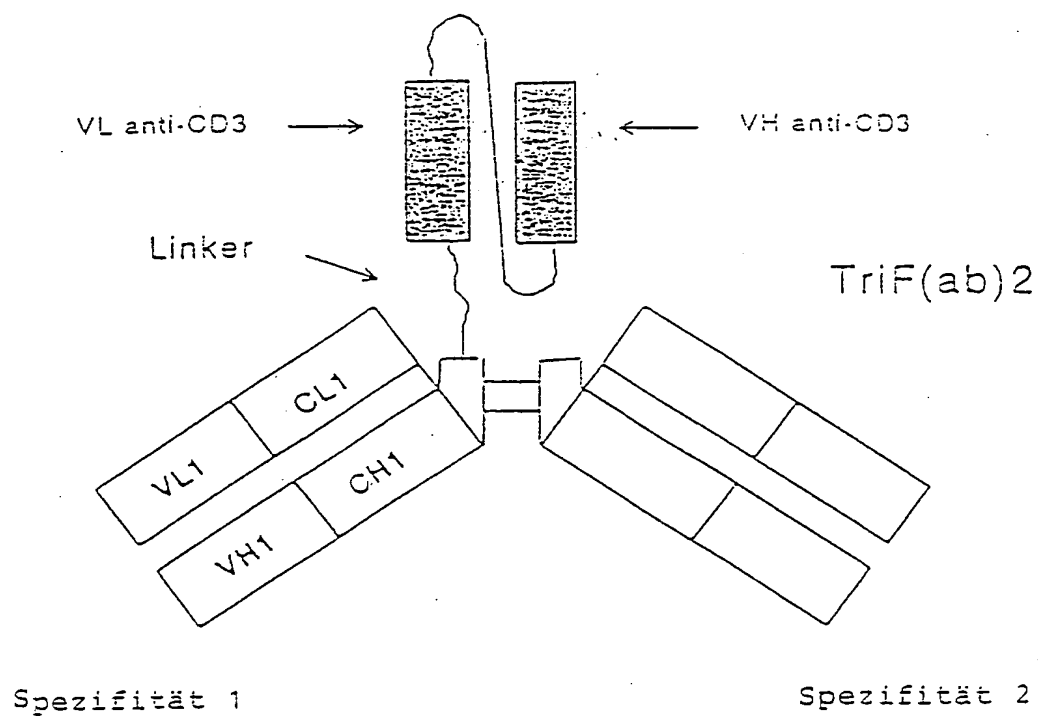
Figur 3



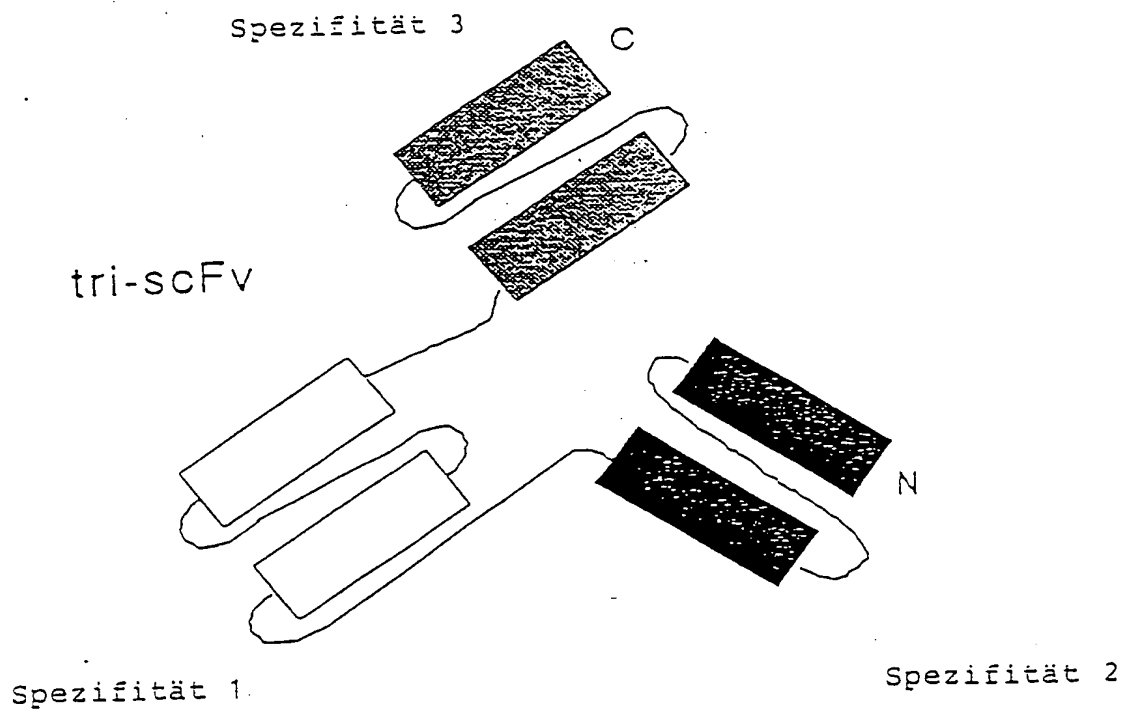
Figur 4



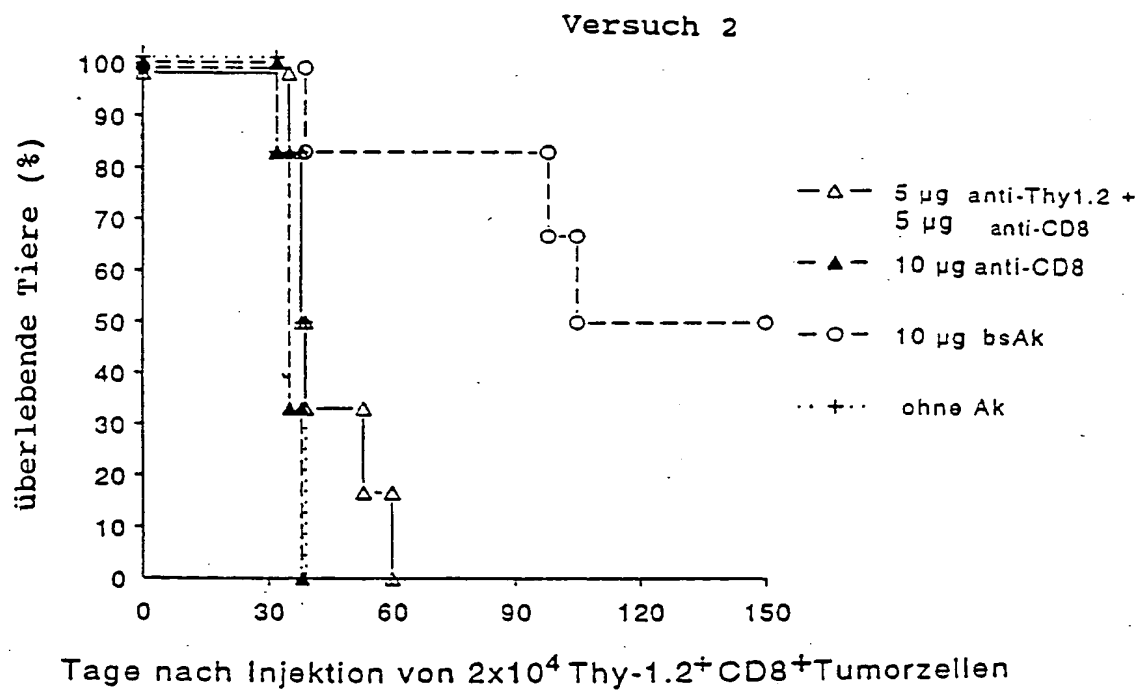
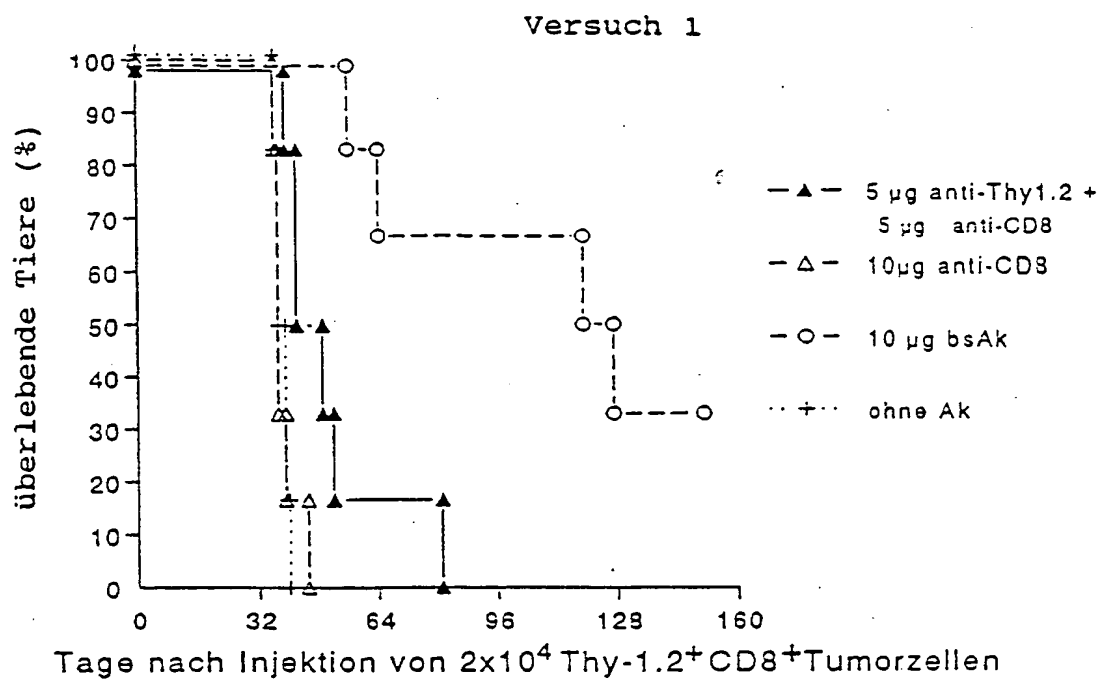
Figur 5



Figur 6



Figur 7



Figur 8